Aus dem Hygienischen Institut
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Wilhelm Ernst

Ueber die Brauchbarkeit verschiedener Milchseren als Ersatz des Labserums zur Agglutination auf Abortus Bang.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Emil Knödler
Tierarzt
aus Oberbettringen

Gedruckt
im Tageblatt-Haus Coburg
1939

Gedruckt mit Genehmigung
des Dekans der Tierärztlichen Fakultät München.

Berichterstatter: Prof. Dr. Ernst.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite:
Einleitung	7
Die Agglutination als Hilfsmittel zum Nachweis von Bangbakterien in der Milch	9
Zusammensetzung der Milch	13
Gerinnung der Milch	13
Agglutination und Agglutinine	15
Vorversuche	16
Prüfung der Milchseren auf ihre Brauchbarkeit zum agglutinatorischen Nachweis von Bangbakterien in der Milch	17
Bleiserum	17
Kupferserum	19
Ammoniumsulfatserum	20
Essigsäureserum	21
Tetraserum	22
Konservierung des Tetraserums	24
Pektin	25
Zusammenfassung	26
Schrifttum	27

Einleitung.

Den Kampf gegen die Abortus-Bang-Infektion des Rindes bestimmen vornehmlich zwei Tatsachen:

1. Die gewaltigen Verluste der deutschen Viehzucht treibenden Landwirte.
2. Die Gefahr der Infektion und Erkrankung des Menschen.

Nach vorsichtigen Schätzungen von Zeller (zit. 52) beträgt der durch Abortus-Bang-Infektion deutscher Viehbestände verursachte jährliche Verlust durch Zuchtschäden (Hemmung des Zuwachses von Jungtieren) Kälber-, Fleisch- und Milchverluste 250 Mill. RM. Das Bestreben, diese ungeheuren Werte an Volksvermögen zu erhalten, lassen das riesengroße Gebiet der einschlägigen Literatur und die ausgedehnten Versuche zur sicheren Diagnosestellung erkennen, denn die erfolgreiche Bekämpfung der Seuche erfordert die Erkennung aller infizierten Tiere, insbesondere aber jener, die auf irgend eine Art Abortus-Bakterien ausstreuen und damit für Tier und Mensch ansteckungsgefährlich werden.

Die großangelegten Pläne der Erzeugungsschlacht, die Anstrebung weitgehendster Selbstversorgung und Nahrungsfreiheit des deutschen Volkes weisen gerade heute dem Tierarzt große Aufgaben zu.

Nach der Statistik des Reichsgesundheitsamtes wird neben der Kontakt-Infektion etwa die Hälfte der Bang-Erkrankungen des Menschen durch Genuß bangbazillenhaltiger Milch verursacht. Dieser Tatsache hat das Reichsmilchgesetz in seinen Ausführungsbestimmungen Rechnung getragen, wonach Milch von Kühen, die den Abortus-Bazillus mit der Milch ausscheiden, erst nach ausreichender Erhitzung in den Verkehr gebracht werden darf. Somit gewinnt der Nachweis der Abortus-Bakterien in der Milch oder der Nachweis ihrer Ausscheidung durch Milchsekretion besondere Bedeutung für die Durchführung der Milchüberwachung.

Die moderne Milchhygiene verlangt mit Recht möglichst bangbakterienfreie Milch für den Konsum, denn wenn auch zum Haften einer Infektion größere Mengen Bakterien und wohl auch eine gewisse Disposition nötig sind, und wenn auch Todesfälle durch die Bangerkrankung nicht bekannt sind, so kann diese doch hartnäckige Formen annehmen und so die Grundlage für viele Gefahren eines chronischen Leidens bilden.

Bei der Abortusforschung und -Bekämpfung kommt der Milch eine hervorragende Bedeutung zu. Das infizierte Euter bringt mit der Milch dauernd Bang-Bakterien ins Freie und ist so eine ständige Infektionsquelle für die Nachbartiere und für den Menschen.

Der Nachweis der Brucellen in der Milch ist technisch nicht ganz einfach, erfordert beträchtlichen Zeit- und Materialaufwand. Das Bestreben zahlreicher Autoren war daher in den letzten Jahren darauf gerichtet, einwandfreie und dabei möglichst einfache und schnellarbeitende Methoden zur Sicherung der Diagnose auszuarbeiten.

Zur Ermittlung von Euterinfektionen und für Massenuntersuchungen, wie sie die amtliche Milchüberwachung erfordert, kommt vornehmlich der agglutinatorische Nachweis von Antikörpern im Milchserum in Frage. Der züchterische Nachweis der Brucellen in der Milch ist wegen der Umständlichkeit und Unzulänglichkeit für Massenuntersuchungen ungeeignet. Der Tierversuch dürfte wegen seiner langen Dauer und Kostspieligkeit auf einen verhältnismäßig kleinen Rest serologisch zweifelhafter Milchen beschränkt bleiben.

Reinhardt und Gauß (36) behaupteten schon 1914, daß die Molkenagglutination für die Diagnose des infektiösen Abortus sehr wohl geeignet sei. Coolidge (4) berichtete im Jahre 1916, daß die Agglutinierprobe für die Untersuchung einer großen Zahl von Milchproben auf die Gegenwart von Bacterium-Abortus wertvoll sei. Proescholdt (35), Happe und Neumark (14), Karsten und Bischoff (18), Schönberg (41), Dopter (6), Kluge (21) u. a. sehen in der Milchserumagglutination ein gutes Hilfsmittel zur Ermittlung bangbazillenhaltiger Milch und sprechen ihr für die Milchhygiene große Bedeutung zu. Die Hauptaufgabe der Milchserumagglutination besteht in der Ermittlung von Euterinfektionen durch die Bang-Bazillen und der Erkennung von Tieren, die Abortus-Bazillen mit der Milch ausscheiden.

Die Agglutination zum Nachweis von Abortus-Bakterien wird gewöhnlich mit dem mittels Lab gewonnenen Serum, der Labmolke, angestellt. Die Gewinnung des Labserums bereitet mitunter große Schwierigkeit, einerseits wegen der Umständlichkeit, andererseits mißlingt es häufig, genügend klares, für die Agglutination brauchbares Serum zu erhalten. Hall und Learmonth (12), Pomper (34), Zeller (49), Karsten (16), Stockmayer (43) u. a. wiesen darauf hin, daß die Zuverlässigkeit der Milchserumagglutination von der Gewinnung eines klaren Milchserums abhängig ist. Die Verwendung trüber Molken dürfte wohl mit ein Grund sein, daß verschiedene Autoren keine befriedigenden Ergebnisse erhielten und daß die Milchserumagglutination nicht immer die gebührende Anerkennung fand.

Die mir gestellte Aufgabe bestand darin, zu suchen, ob es mit einfachen chemischen Mitteln, auf einfachem, billigem und wenig zeitraubendem Wege gelingt, ein klares, noch aktiv wirkendes und für die Agglutination auf Abortus-Bang geeignetes Milchserum herzustellen.

Die Agglutination als Hilfsmittel zum Nachweis von Abortus-Bang-Bakterien in der Milch.

Nachdem der Nachweis von Abortus-Bang-Bakterien in der Milch gelungen war, lag der Gedanke nahe, daß sich in der Milch infizierter Tiere auch die spezifischen Antikörper finden. Die ersten Agglutinationsversuche zum Nachweis von Brucella-Agglutininen in der Milch stellten Mc Fadyean und Stockman (24) im Jahre 1909 und später 1911 Sven Wall (46) an. Ueber ihre Technik ist wenig bekannt. Vermutlich verwendeten sie reine, unbehandelte Milch. Ihre Ergebnisse waren daher wenig befriedigend, so daß sie diese Methode für nicht geeignet fanden. Sven Wall (46) hielt die Verwendung von Milch für nicht empfehlenswert, da deren optische Eigenschaften die Agglutination in hohem Maße störten.

In Anlehnung an die Blutserumagglutination gingen verschiedene Forscher von der Ueberlegung aus, daß die spezifischen Antikörper der Bang-Bakterien in das Serum übergehen und verwendeten statt reiner Milch das Milchserum. Am häufigsten wird zur Gewinnung des Serums das Labferment verwendet. Den Labsorten kommt eine bestimmte Labstärke zu, die durch diejenige Menge Milch bestimmt ist, die von einem Teil Lab in 40 Minuten bei 35 Grad C. gelabt wird (nach 7).

Die Technik der Molkengewinnung weist bei den einzelnen Untersuchern mehr oder weniger große Unterschiede auf. Meist werden die Milchproben vor dem Einlaben 10—30 Minuten bei 900—3000 Umdrehungen zentrifugiert, um den Hauptteil des störenden Milchfettes zu eliminieren. Die Menge des verwendeten Labs ist von der Konzentration der Lablösung und von der Labstärke abhängig. Die Einlabungszeit schwankt zwischen 10 Minuten und 24 Stunden, wobei die eingelabte Milch in ein Wasserbad von 45 Grad C gesetzt oder im Brutschrank gehalten wird. Das abgeschiedene Serum wird abfiltriert oder durch Zentrifugieren gewonnen.

Reinhardt und Gauß (36) machten die ersten Angaben über die Form und Zubereitung der Milch zu serologischen Untersuchungen: 30 ccm Milch wurden im Wasserbad auf 45 Grad C erwärmt, eine kleine Messerspitze Labpulver zugesetzt, gut durchmischt und eine halbe Stunde im Wasserbad bei 45 Grad C gehalten. Nach

dieser Zeit hatte sich das Milchserum in der Regel als grünliche, verhältnismäßig klare Flüssigkeit abgeschieden, die von dem weißlichen Koagulum abfiltriert wurde. Es gelang nicht immer, auf diese Weise ein brauchbares, genügend klares Serum zu erhalten. Weiter verwendeten Labpulver Coolidge (4), Marcis (25), Winkler (47), Hetz (15). Coolidge (4) verwendete bei Verdünnungen von 1:50 und höher reine Milch zur Agglutination, während er bei geringeren Verdünnungen mit dem mittels Lab gewonnenen Serum arbeitete.

Labessenz verwendeten Robinson (38), Schönberg (41), Lübke (23), Nieland (29). Robinson (38) setzte der Milch Labessenz im Verhältnis 1:80 zu, wobei sich sofort ein festes Kaseingerinnsel bildete, aus dem sich nach 1—2 Stunden ein klares Serum auspreßte. Schönberg (41) und Nieland (29) gaben zu 15 ccm Magermilch 0,5 ccm Labessenz zu und filtrierten nach zweistündigem Brutschrankaufenthalt das sich klar abgesetzte Serum ab. Lübke (23) stellte das Milchserum nach eigener Methode her, indem er 10 ccm Milch mit drei Tropfen Labessenz vermischte und 20 Minuten im Brutschrank hielt. Die eingelabte Milch wurde mit einer Impfnadel durchgerührt und 5—10 Minuten zentrifugiert. Trüben Seren setzte er einige Tropfen gesättigte Chlorkalziumlösung zu, zentrifugierte nach erneutem Brutschrankaufenthalt.

Am häufigsten wird Lab in Form von Lablösung verwendet, die aus Labpulver oder -Tabletten hergestellt wird. Zeller (49) hat Lablösung bei seinen Untersuchungen als die geeignetste Form gefunden. Außer ihm verwendeten Lablösung Gilman (10), Mitchell und Humphreys (27), Hetz (15), Karsten (16), Proescholdt (35), Meyer (26), Poeschl (33), Summa (44), Fuest (9), u. a. Gilman (10), dessen Technik der von Zeller angegebenen entspricht, gibt zu 20 ccm Mittelmilch 3 Tropfen einer 10%igen Lablösung. Nach gründlichem Schütteln wird die Milch 10—15 Minuten in ein Wasserbad von 45 Grad C gesetzt, worauf sich gewöhnlich eine genügend klare Molke abgeschieden hatte.

Zur Unterstützung der Labgerinnung setzten Klimmer (20), Riedmüller (37), Lübke (23) einige Tropfen gesättigter Chlorkalziumlösung zu.

Da Pomper (34) trotz Zentrifugierens und mehrmaligen Filtrierens häufig ungenügend helle Seren erhielt, benutzte er zur Klärung der trüben Molken Filtrierröhrchen, die er mit Asbest und später mit mehreren Lagen Fließpapier beschickte und an eine Saugpumpe anschloß.

Schon frühzeitig wurden Milchseren auf chemischem Wege hergestellt. Seddon (42) berichtete 1915 über seine Agglutinationsversuche mit Milchseren, die er auf folgende Weise gewann: 9 ccm Milch werden mit 1 ccm einer 10%igen Milchsäure gemischt.

Nach Brutschrankaufenthalt wird das Koagulum durch Baumwolle und Papierfilter oder durch Papierfilter allein filtriert. Karsten (16), Vellisto (45) erwähnen, daß auch Milchseren, die durch Tätigkeit von Milchsäurebakterien bei Brutschrank- oder Zimmertemperatur gewonnen werden, für die Agglutinierprobe verwendet werden können. Ersterer, sowie Pomper (34) und Zeller (49) halten diese jedoch für wenig geeignet zu serologischen Untersuchungen. Vellisto (45) hält das Labserum am geeignetsten zur Bestimmung des Agglutinationstiters; zuweilen sind nach seinen Angaben die durch Milchsäuregärung oder mit Essigsäure gewonnenen Seren geeigneter.

Die mit Lab gewonnenen Seren befriedigten vielfach wenig, da die mehr oder weniger starke Trübung der Molken die Agglutination empfindlich stört, eine einwandfreie Untersuchung und genaue Titerbestimmung nicht zuläßt.

Da das emulgierte Milchfett trotz Zentrifugierens und Labgerinnung nie vollständig abgeschieden werden kann und somit den Hauptfaktor für trübe, die Milchagglutination störende Milchseren bildet, suchten verschiedene Autoren das Milchfett mit Fettlösungsmitteln auszuziehen. Hall und Learmonth (12) haben verschiedene Fettlösungsmittel geprüft und dabei Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff für sehr geeignet gefunden. Aether und Benzin haben ein geringeres spezifisches Gewicht als Milch und sind daher unbrauchbar, denn beim Zentrifugieren schichtet sich das Fett und sein Lösungsmittel über das Serum, so daß dieses nicht abgegossen werden kann. Vor dem Verschicken der Milchgläser zur Entnahme von Milchproben wurden in diese einige ccm des Fettlösungsmittels und etwas Labeextrakt gefüllt und zugekorkt. Nach Ankunft im Laboratorium wurden die Proben eine Stunde in den Brutschrank gesetzt und hernach 15 Minuten lang bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert, wobei sich oben ein klares Serum absetzte, während das Kasein in der Mitte, das Fett und sein Lösungsmittel am Grunde des Glases blieb. Karsten (17) konnte bei seinen Versuchen über den serologischen Nachweis der Eutertuberkulose trübe Molken durch Zugabe von 4—5 Tropfen Chloroform zu 10 ccm Milch hinreichend klären. Allerdings erwähnen Karsten und Bischof (18), daß sie selbst nach Ausschleudern mit hochtourigen Zenrtifugen oder nach kräftigem Durchschütteln unter geringem Chloroformzusatz nicht immer klare Molken erhielten, die einwandfreie Ergebnisse sicherten.

Diernhofer (5) prüfte eine Reihe von Milchseren, die bei anderen Milchuntersuchungen verwendet werden, auf ihre Brauchbarkeit für den Agglutininnachweis in der Milch. Die mit Ferrum oxychloratum dialysatum, Trichloressigsäure, Zinkoxyd gewonnenen Seren waren unbrauchbar, da die Agglutinine gleichzeitig mit dem

Kasein ausgefällt werden. Dagegen fand er das Bleiessigserum und das Kupfervitriolserum für geeignet. Allerdings stellten sich in den Röhrchen mit stärkerer Serumkonzentration leicht Trübungen und Niederschläge ein, die Diernhofer (5) als Reaktionsprodukte der im Serum verbleibenden Metallsalze mit der Testflüssigkeit ansprach. Durch Zugabe von sekundärem Natriumphosphat ließen sich die Metallspuren nachträglich ausfällen. Das störende Schwimmen von Fettkügelchen verhinderte er durch Ausschütteln mit Chloroform. Die nicht ganz einfache Herstellungsweise dieses Serums war demnach folgende: In ein Reagenzglas wird nacheinander 0,5 ccm Chloroform, 6 ccm der zu untersuchenden Milch, 0,35 ccm einer 40%igen Bleiessiglösung (oder 0,3 ccm einer 17,5%igen Kupfervitriollösung) zugegeben. Nach leichtem Umschütteln wird 0,5 ccm einer gesättigten, wässerigen Lösung von sekundärem Natriumphosphat zugesetzt, kräftig geschüttelt und 5—10 Minuten bei 2—3000 Umdrehungen zentrifugiert. Das hierbei erhaltene Serum war vollkommen klar. Die Umständlichkeit und die Möglichkeit, daß dieses Serum in manchen Fällen der Labmolke nicht ebenbürtig sein könnte, veranlaßte Diernhofer (5), die Labung der Milch mit Chloroformzusatz zu verbinden.

Stockmayer (43) machte die Zuverlässigkeit der Milchserumagglutination von der Gewinnung eines klaren Milchserums abhängig, das sich nur durch vollständiges Entfernen des Milchfettes erzielen läßt. Mit geringer Modifikation stellte er das Milchserum nach der von Diernhofer (5) angegebenen Lab-Chloroform-Methode her. Nach Zugabe von 0,5 ccm Labextrakt zu 20 ccm Milch und einstündigem Brutschrankaufenthalt wird die Probe zur Abkühlung bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hierauf werden 2 ccm Chloroform zugegeben, kräftig geschüttelt und sofort zentrifugiert. Nur selten mußte das Serum noch durch Asbestwatte filtriert werden.

Kluge (21) verwendete bei der laufenden Milchkontrolle das „Ammoniumsulfatgrenzserum" zu serologischen Untersuchungen. Neben der Prüfung auf Typhus und Paratyphus untersuchte er die Milch auf Bang-Bakteriengehalt und fand in der Agglutination im „Grenzserum" ein wichtiges Hilfsmittel für die hygienische Milchkontrolle. Durch Zusatz von soviel Ammoniumsulfat, das gerade eine „Brechung" eintritt, wurde das Kasein ausgefällt, während in dem klaren Filtrat die Albumine und Globuline noch enthalten waren. Dieses „Grenzserum" gewann er, indem er zu 50 ccm Milch zwei Tropfen einer 30%igen Essigsäure und 10 gr kristallisiertes Ammoniumsulfat zugab, die Mischung nach wiederholtem Umschütteln etwa 15 Minuten bei Zimmertemperatur bis zur vollständigen Lösung des Salzes stehen ließ und dann filtrierte. Bei nicht klaren Seren setzte er noch vorsichtig etwas Ammoniumsulfat hinzu.

Zusammensetzung der Milch.

Um den Vorgang, der sich im Gefüge der Milch bei der Serumgewinnung abspielt, besser zu verstehen, ist es tunlich, sich kurz über die Zusammensetzung der Milch, über das Wesen und die Eigenschaften ihrer Hauptbestandteile zu orientieren.

Die Milch ist ein polydisperses System, in dem gelöste, gequollene, emulgierte und ungelöste Stoffe suspendiert sind. In echter Lösung befindet sich der Milchzucker und ein Teil der Salze; kolloidal gelöst sind die Eiweißkörper, und zwar in grobdisperser Form das Kasein, in feindisperser Form das Albumin und das Globulin. Die gelösten und gequollenen Substanzen bilden das Milchplasma. In Emulsion befindet sich das Milchfett. In suspendiertem Zustand sind endlich die nicht gelösten Salze. Das Kasein und das Fett oder Reste dieser beiden Stoffe sind es vor allem, die die Agglutination hemmen oder störend beeinflussen.

Das Kasein, der für die Milch charakteristische Eiweißkörper, ist eine schwache Säure, kann aber auch Basencharakter annehmen. In der Milch findet sich das Kasein als Kalksalzverbindung, und zwar als Dikalziumkaseinat in gequollenem Zustand. Das Milchalbumin und das Milchglobulin sind die beiden anderen, besonders für die Agglutination wichtigen Eiweißkörper. Beide sind eng verwandt mit dem Albumin und Globulin des Blutserums. Von ganz besonderer Bedeutung für die Serumagglutination sind die Globuline, da die Bakterienantikörper, die Agglutinine, mit ihnen in engem Zusammenhang stehen.

Das Milchfett ist in Form kleinster Kügelchen emulgiert.

Die Gerinnung der Milch.

Das Wesen der Gerinnung der Milch beruht darauf, daß das in gequollenem Zustand sich befindliche Kasein ausgefällt wird und dabei die übrigen in ungelöstem Zustand sich befindlichen Stoffe mit sich reißt. Diese Ausfällung des Kaseins kann durch das Labferment oder durch Säuren erfolgen.

A. Labgerinnung:

Das Lab, das aus der Schleimhaut von Kälbermägen gewonnene Enzym hat die Fähigkeit, das phosphorhaltige Dikalziumkaseinat der Milch in Parakasein und Molkeneiweiß zu zerlegen. Diese Zerlegung ist ein chemischer Vorgang, der für das Auge unsichtbar ist. Die Umwandlung des Kaseins zu Parakasein und Molkeneiweiß beruht auf einer Spaltung des Kaseins oder auf einer Gruppenumlagerung im Molekül oder gar nur auf einer Aenderung des

physikalischen Zustandes (nach 7). Im Gegensatz zu Hammarsten (13) hält Beau (2) das Parakasein nicht für ein Spaltprodukt, sondern für ein Polymerisationsprodukt. Er vertritt die Theorie, daß das Labenzym die Bindungen des Kaseinmoleküls löst, die sich anderweitig wieder zusammenschließen, wobei das unbeständige Kalzium-Phosphorkaseinat in das beständige Parakasein übergeht. Die Ausfällung des Parakasein erfolgt sekundär bei Anwesenheit von Erdalkalisalzen, während das Molkeneiweiß gelöst in der Molke zurückbleibt (nach 11). Die Labgerinnung der Milch ist demnach ein Vorgang, der sich aus zwei Teilreaktionen zusammensetzt. Da die Ausfällung des Kaseins von der Anwesenheit löslicher Kalksalze abhängig ist, so tritt überall dort, wo der Gehalt dieser Salze in der Milch abgenommen hat, eine schlechte Molkenbildung ein. Klimmer (20), Riedmüller (37), Lübke (23) empfahlen daher, bei der Gewinnung von Molken zur Milchserumagglutination den Zusatz einiger Tropfen gesättigter Chlorkalziumlösung zu der mit Lab versetzten Milch. Mit zunehmender Azidität erhöht sich die Geschwindigkeit des Molkenaustrittes und die Molkenmenge. Das Wirkungsoptimum der Kalziumkonzentration für die Molkenabscheidung besteht nach Wurster (48) bei 0,6 pro Mill., während höhere Konzentrationen hemmend wirken. Der Labungsvorgang ist in seinen einzelnen Phasen durch äußere Faktoren beeinflußbar. Laquer (zit. 28) unterscheidet dreierlei Einflüsse:

1. Den auf das Labferment.
2. Den auf die Wirkung des Labungsvorganges.
3. Den auf die Ausfällung des Kaseins.

Wurster (48) macht die Molkenabscheidung auch von dem Material der die Milch enthaltenden Gefäße abhängig, da die Haftung des Labkoagulums an der Gefäßwand der Retraktion und somit der Molkenauspressung entgegenwirkt.

B. Säuregerinnung:

Die Milch kann durch Zusatz jeglicher Säure, sowohl anorganischer wie organischer in kürzester Zeit zur Gerinnung gebracht werden. Infolge seines basischen Charakters geht das Kasein mit den Säuren Verbindungen ein. Dem Kaseinat wird Kalzium entrissen; das Kasein fällt aus.

Hammarsten (13) hat schon in seinen grundlegenden Versuchen festgestellt, daß die Fällung des Kaseins durch Säuren und durch Lab zwei chemisch durchaus verschiedene Vorgänge sind, obwohl beide Vorgänge äußerlich oft schwer zu unterscheiden sind. Die Ausfällung des Kaseins erfolgt durch geringe Säuremengen. Bei Ueberschuß von Säuren geht das ausgefallene Kasein wieder in Lösung. Pfleiderer (31) untersuchte die verschiedene Gerinnungs-

intensität einzelner Säuren. Weitere Untersuchungen ergaben, daß der günstigste Säuregrad zur Labfällung bei einer H-Jonen-Konzentration von $2{,}5 \times 10^{-5}$ liegt. Bei Anwesenheit von Kalksalzen wird das Säurefällungsoptimum nach der sauren Seite verschoben.

Agglutination und Agglutinine.

Die Agglutination bezeichnet man als die Verklumpung der in einer Flüssigkeit frei suspendierten Bakterien bei Zusatz von agglutinierenden Serumsubstanzen, die als Agglutinine im Gegensatz zu Agglutination durch Chemikalien bezeichnet werden. Agglutinine sind Substanzen des Serums, welche von Bakterien spezifisch gebunden werden und diese zu verkleben und zu fällen imstande sind. Die Agglutination ist als eine echte Kolloidreaktion zu bezeichnen. Die Bakteriensuspension und die Agglutinine im Serum gehen eine spezifische Bindung ein, als deren Folge eine Aenderung der Lösungsverhältnisse und der Oberflächenspannung eintritt. Die suspendierten Bakterien können auch durch Salze, Alkalien, Säuren ausgeflockt werden (nach 40).

Die Agglutinine stehen mit den Serumglobulinen in physikalisch-chemischer Beziehung, doch ist die Frage noch nicht geklärt, ob die Antikörper als besondere Modifikation der Globuline selbst oder chemische Substanzen von unbekannter Konstitution sind (nach 1). Die Feststellung, daß die Agglutinine an das Serumglobulin gebunden sind, geht auf Widal und Sicard, Winterberg zurück (zit. 30).

Nach Wolf, Schierge, Went (zit. *22*) sind die Agglutinine nicht als identisch mit den Globulinen anzusehen, sondern nur adsorptiv an diese gebunden. Ehrlich und Breyer (zit. *22*) nahmen an, daß es sich bei der Fällung um ein mechanisches Mitreißen handelt.

Die Agglutinine werden durch Erhitzen auf höhere Temperaturen zerstört, durch Magnesiumsulfat und Ammoniumsulfat werden sie vollständig, durch Natriumsulfat fast vollständig, durch Natriumazetat, Kaliumnitrat unvollständig gefällt, während Natriumchlorid geringe Fällung erzeugt (zit. *22*).

Malvoz (zit. *22*) untersuchte zahlreiche Substanzen, die Koagulation erzeugen, auf agglutinierende Wirkung und fand dies bei Formalin und Sublimat bestätigt, während Carbolsäure, Chloroform, Milchsäure und die schweren Säuren, außer Salizylsäure, keine Agglutination bewirkten.

Vorversuche.

Bei der Herstellung von Milchseren für Agglutinationsversuche ist in erster Linie auf den Charakter der Agglutinine zu achten. Methoden, bei denen sie denaturiert oder mitausgefüllt werden, scheiden für die Serumherstellung zu Agglutinationszwecken aus. Dasjenige Milchserum, das auf einfachste Art vollständig klar gewonnen wird, dabei die Agglutinine unverändert enthält, und keine die Agglutination beeinflussenden, störenden Stoffe beherbergt, genießt den Vorzug.

Die für die spätere Serumherstellung benötigten chemischen Stoffe prüfte ich zunächst auf ihr Verhalten der Testflüssigkeit gegenüber, indem ich diese Stoffe wie Milchseren behandelte, d. h. in Mengen, wie es bei Seren üblich ist, der Testflüssigkeit zumischte.

Die Testflüssigkeit zu meinen Versuchen wurde folgendermaßen hergestellt: 5 gut agglutinable Stämme vom Reichsgesundheitsamt wurden auf Agar in Kolleschalen verimpft, in den Brutschrank gesetzt, bis die Kulturen üppig angegangen waren und ein dichter Rasen sich gebildet hatte, was gewöhnlich in 4—5 Tagen der Fall war. Die Reinkulturen wurden dann mit wenig Carbolkochsalzlösung (physiol. Kochsalzlösung +0,5 % Acidum carbolicum) abgeschwemmt und durch Glaswolle filtriert. Diese dicke Stammsuspension wurde mit Carbolkochsalzlösung nach einem Vergleichsröhrchen zu der gebrauchsfertigen Testflüssigkeit verdünnt.

Von liquor plumbi subacetici (D. A. B. 6.), Kupfersulfat (17,5 % Lösung), Ammoniumsulfat (20 %), Essigsäure (20 %), Tetrachlorkohlenstoff, Carbolkochsalzlösung pipettierte ich Verdünnungen von 0,4 — 0,2 — 0,1 — 0,05 — 0,04 — 0,02 — 0,01 in Agglutinierröhrchen und gab zu jeder Probe 1 ccm Testflüssigkeit zu, schüttelte gründlich durch und ließ nach 12stündigem Brutschrankaufenthalt die Proben bei Zimmertemperatur 24 Stunden stehen. Das Ablesen der Ergebnisse erfolgte in der Weise, daß mit Hilfe eines Spiegels die Form des Bakterienbodensatzes festgestellt wurde. Die Beurteilung des Ergebnisses geschah dermaßen, daß eine Punktbildung auf der Kuppe des Röhrchens als negativ bezeichnet wurde, wie es bei der Agglutination zur Rotzdiagnose nach Schütz-Schubert erfolgte.

Ergebnis des Vorversuches.

Sämtliche Proben zeigten eine kleine klare Punktbildung; die verwendeten Säuren, Salze und sonstigen chemischen Substanzen er-

zeugten keinerlei Agglutination. Spontanagglutination und unspezifische Agglutinierbarkeit war nicht vorhanden.

Bei Zugabe von Testflüssigkeit zu liquor plumbi subacetici trat eine grünlich-weiße Flockenbildung ein, die sich schnell zu Boden setzte.

Prüfung von Milchseren auf ihre Brauchbarkeit zum agglutinatorischen Nachweis von Bang-Bakterien in der Milch.

Zu meinen Versuchen stand mir die Milch eines abortusdurchseuchten Viehbestandes zur Verfügung. Die Entnahme von Viertelgemelksproben erfolgte nach Entfernung der ersten Strahlen aus der Abendmilch in der gewöhnlichen Weise, jedoch möglichst sauber. Die Milchproben wurden nach Tier und Euterviertel gekennzeichnet. Um bei meinen Versuchen eine Kontrolle und Vergleichsmöglichkeit zu haben, stellte ich von jeder Milchprobe gleichzeitig Labserum her. Das Labserum gewann ich, indem in einem Reagenzglas 10 ccm Milch mit 0,5 ccm Lablösung versetzt, gut durchmischt und in den Brutschrank gestellt wurden.

Die Lablösung stellte ich mit Labtabletten her, indem ich eine halbe Tablette in 50 ccm Aqua dest. löste.

Nach etwa 12stündigem Brutschrankaufenthalt wurden die eingelabten Proben durch Papierfilter filtriert. Die grünlichen Molken waren teils klar, teils hauchig getrübt, teils enthielten sie noch reichlich Kaseinflocken und Fettkügelchen, so daß ihre Klarheit vielfach trotz wiederholten Filtrierens wenig befriedigte.

Bleiserum.

Das durch basisches Bleiazetat leicht, schnell und auffallend klar zu gewinnende Bleiserum gibt Veranlassung, es weitgehend zu milchserologischen Untersuchungen heranzuziehen. Rothenfusser (39), dem wir die Herstellung dieses Serums verdanken, legte in seinen Untersuchungen fest, daß das Optimum des Zusatzes von Bleiessig je nach der Milchbeschaffenheit zwischen 6—12 ccm zu 100 ccm Milch liege. Frangulis (8) stellte Bleiserum her, indem er 5,5 ccm basisches Bleiazetat zu 100 ccm Milch gab, einige Sekunden schüttelte und filtrierte. Rothenfusser (39) deutete schon an, daß sein Bioserum infolge seiner biochemischen Eigenschaften vielleicht auch zu serodiagnostischen Zwecken Verwendung finden könne. Bei Massenuntersuchungen vermied er das Filtrieren, indem er neben Bleiessig ungefähr die gleiche Volumenmenge Trichloraethylen zusetzte und nach festem Durchschütteln zentrifugierte, wobei sich das Serum als klare obere Schicht zeigte.

Zur Gewinnung des Bleiserums füllte ich von jeder Milchprobe 10 ccm in ein Reagenzglas und gab jeweils 0,6 ccm basisches Bleiazetat zu, schüttelte kräftig um und filtrierte den Brei durch ein Faltenfilter. Das sich sofort in genügender Menge abscheidende Serum war wasserklar, zeigte einen gelblich-grünen, zuweilen blau-grünen Schimmer. Bei einigen Proben genügte der Zusatz von 0,6 ccm Bleiazetat nicht zur Gerinnung der Milch. Diesen Milchen setzte ich weitere 0,6 ccm Bleiazetat zu, wobei sich dann immer das Serum gewinnen ließ. Das Bleiserum ist praktisch frei von Kasein und Fett.

Um einen Ueberblick über das Schicksal der im Bleiserum event. vorhandenen Agglutinine zu erhalten und zur Bestimmung der Titerhöhe der einzelnen Viertelsgemelke, führte ich die Röhrchenagglutination mit dem Bleiserum und vergleichend mit dem Labserum durch.

Bei allen meinen Versuchen stellte ich von jeder Serumprobe eine ¼-Stammlösung her, indem ich 1 ccm des Serums mit 3 ccm Karbolkochsalzlösung vermischte und daraus folgende Mengen in die Agglutinierröhrchen pipettierte.

Tabelle I.

Verwendete Menge der ¼ Serumlösung ccm	Darin ist enthalten Serum in ccm	Bakt. Menge als Test-Flüssigkeit	Verdünnung d. Serums z. Bakt. Menge ungefähr wie
0,4	0,1	1	1 : 10
0,2	0,05	1	1 : 20
0,1	0,025	1	1 : 40
0,05	0,0125	1	1 : 80
0,04	0,01	1	1 : 100
0,02	0,005	1	1 : 200
0,01	0,0025	1	1 : 400

Jeder Verdünnung wurde 1 ccm Gebrauchstest mit der Pipettiermaschine zugesetzt. Bei Zusatz von Karbolkochsalzlösung zum Bleiserum trat bei einigen Proben eine grünlich-weiße Flockenbildung auf, die sich schnell zu Boden setzte. Nach 12stündigem Brutschrankaufenthalt wurden die Agglutinierröhrchen bei Zimmer-Temperatur aufgestellt und am folgenden Tag die Ergebnisse mittels Spiegel abgelesen.

Tabelle II.

Kuh Nr.	Euterviertel	Agglutinationstiter. Labserum	Bleiserum
829	vo. re.	80	20
	vo. li.	400	80
	hi. re.	80	20
	hi. li.	400	80

Kuh Nr.	Euterviertel	Labserum	Bleiserum
790	vo. re.	80	20
	vo. li.	80	20
	hi. re.	100	10
	hi. li.	100	20
696	vo. re.	80	20
	vo. li.	keine Probe	—
	hi. re.	200	40
	hi. li.	200	40
748	vo. re.	200	40
	vo. li.	200	80
	hi. re.	200	40
	hi. li.	100	40
	Marktmilch	neg.	neg.
Testflüssigkeit (Kontrolle)		neg.	

Beurteilung des Bleiserums.

Das Bleiserum hat sich bei meinen Versuchen zum agglutinatorischen Nachweis von Bang-Bakterien in der Milch nicht bewährt. Der Agglutinationstiter des Bleiserums beträgt in allen positiven Proben nur etwa 1/5 der Titerhöhe des Labserums. Das Bleiazetat hat demnach den größten Teil der Agglutinine gemeinsam mit dem Kasein ausgefällt. Bei negativer Agglutination im Labserum zeigte auch das Bleiserum keine Agglutination.

Je mehr Bleiessig zur Serumgewinnung verwendet wird, desto mehr Agglutinine scheinen ausgefällt zu werden.

Diernhofer (5) hat bei der Untersuchung verschiedener Milchseren das Bleiessigserum zur Agglutination für geeignet befunden. Er fällte vor der Agglutination die im Serum verbleibenden Metallspuren durch geringen Zusatz von Natriumphosphat aus, um Trübungen bei der Agglutination zu vermeiden.

Kupferserum.

Das Kupferserum gewann ich nach den Angaben Beckel's (3). Zunächst stellte ich eine 17,5 %ige Kupfersulfatlösung her, indem ich 17,5 gr. des festen Kupfersulfates nach vorherigem Reinigen in einem Wasserbad in 82,5 ccm Aqua dest. auflöste. Nach Zusatz von 0,5 ccm dieser Lösung zu 10 ccm Milch schüttelte ich mit einigen kräftigen Stößen durch und filtrierte sofort das entstandene Koagulum durch

ein gewöhnliches Papierfilter. Nach einigen Minuten hatte sich ein klares Serum abgeschieden.

Durch Kupfersulfat wird das Kasein und das Fett ausgefällt. Ein Teil des Kupfersulfates bleibt in Lösung und gibt dem Kupferserum eine blaugrüne Farbe.

Ammoniumsulfatserum.

Trotz der bekannten Tatsache, daß die Agglutinine durch Ammoniumsulfat ausgefällt werden, prüfte ich das Ammoniumsulfatserum auf seine Brauchbarkeit zur Agglutination, denn Kluge (21) berichtet, daß ihm bei der laufenden Milchkontrolle das „Ammoniumsulfatgrenzserum" zur agglutinatorischen Prüfung auf Abortus-Bang-Infektion ein wichtiges Hilfsmittel sei und wertvolle Dienste geleiset habe.

Er versetzte die Milch mit festem Ammoniumsulfat, so daß gerade eine „Brechung" eintrat, wobei das Kasein ausfiel, während im Serum die Albumine und Globuline zurückblieben. Diesen Zustand erreichte er, indem er zu 50 ccm Milch 2 Tropfen 30 %ige Essigsäure und 10 gr. kristallisiertes Ammoniumsulfat zusetzte, die Mischung bis zur Lösung des Salzes etwa 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen ließ und hernach filtrierte.

Das gewonnene Serum verdünnte er mit Wasser im Verhältnis 1:12, um die aussalzende Wirkung des Ammoniumsulfats im Antiserum zu vermeiden.

Bei der Prüfung des Ammoniumsulfatserums auf seine Brauchbarkeit zur Milchserumagglutination setzte ich zu 10 ccm Milch 1 Tropfen Essigsäure und 2 gr. kristallisiertes Ammoniumsulfat zu, ließ die Mischung bis zur völligen Lösung des Salzes stehen, wobei ich öfters umschüttelte. Bei der Filtration durch gewöhnliches Papierfilter erhielt ich ein absolut klares Serum. Wie bei allen Agglutinationsversuchen verdünnte ich das Ammoniumsulfatserum, indem ich zu 1 ccm Serum 3 ccm Karbolkochsalzlösung zusetzte und daraus die üblichen Verbindungen pipettierte.

Tabelle III.

Kuh Nr.	Euterviertel	Agglutinationstiter		
		Labserum	Kupferserum	Ammoniumsulfatserum
748	vo. re.	20	20	10
	vo. li.	80	40	20
	hi. re.	40	40	20
	hi. li.	20	20	20

Kuh Nr.	Euterviertel	Labserum	Kupferserum	Ammonium-sulfatserum
	vo. re.	100	80	20
	vo. li.	100	100	20
790	hi. re.	100	80	40
	hi. li.	200	100	40
	vo. re.	80	80	20
	vo. li.	100	100	20
829	hi. re.	80	40	20
	hi. li.	200	100	20
Marktmilch		neg.	neg.	neg.
Testflüssigkeit (Kontrolle)		neg.		

Beurteilung des Kupfer- und Ammoniumsulfatserums.

Das Kupferserum ließ sich auf kaltem Wege durch einfaches Filtrieren rasch und klar gewinnen. In der Hälfte der Proben stimmte die Titerhöhe des Kupferserums mit der des Labserums überein. Der Agglutinationstiter der anderen Serumproben war um eine Verdünnung niedriger. Das Kupfersulfat fällt demnach auch Teile der Globuline mit dem Kasein aus.

Das Kupferserum ist sehr haltbar. Durch langes Stehen bei Zimmertemperatur verändert es sich nicht.

Das Ammoniumsulfatserum hat sich bei meinen Versuchen zum Agglutininnachweis nicht bewährt. Fast alle Serumproben agglutinierten mit einem Titer von 1:20, so daß also keine zahlenmäßige Beziehung zum Agglutinationstiter der entsprechenden Labseren bestand. Das Ammoniumsulfat hat erwartungsgemäß den größten Teil der Agglutinine ausgefällt. Inwieweit das Verdünnen des Serums mit Wasser im Verhältnis 1:12, wodurch die aussalzende Wirkung im Antiserum verhindert werden soll, einwandfreie Ergebnisse sichert, habe ich nicht geprüft.

Die Gewinnung des Ammoniumsulfatserums ist nicht ganz einfach, denn das Abwiegen der Ammoniumsulfatkristalle, das mehrmalige Umschütteln und die Dauer des Auflösens erfordert ziemliche Arbeit und Zeit und steht daher in dieser Beziehung den anderen Seren nach.

Essigsäureserum.

Säuren fällen das Kasein der Milch aus, wobei das Milchfett mehr oder weniger vollständig mitgerissen wird.

Das Essigsäureserum stellte ich folgendermaßen her: 10 ccm Milch wurden in einem Reagenzglas mit 0,2 ccm einer 20%igen

Essigsäure gemischt, mit einigen kräftigen Stößen durchgeschüttelt und durch gewöhnliches Papierfilter abfiltriert. Bei einigen Milchproben genügte der Zusatz von 0,2 ccm Essigsäure zur Serumabscheidung nicht, was wohl auf dem Kolostralcharakter oder die alkalische Reaktion der Milch zurückzuführen sein dürfte. Bei Zugabe von weiteren 0,1 — 0,2 ccm Essigsäure trat dann gewöhnlich Koagulation ein. Die Serumabscheidung erfolgte langsam, das grünlich-blaue Serum war durch Gehalt von emulgiertem Fett ziemlich trübe.

Tetraserum.

Die Nachteile des Essigsäureserums, die seiner Verwendung für die Massenkontrolle in der Milchwirtschaft im Wege standen, zu beheben, gelang Pfyl und Turnau (32) durch Zusatz von Tetrachlorkohlenstoff als Fettlösungsmittel. Das Tetraserum hat dem Essigsäureserum gegenüber den Vorzug, daß es durch Verwendung eines spezifischen Fettlösungsmittels neben dem Kaseinfällungsmittel vollständig frei von den sonst die Trübung verursachenden Fettresten ist.

Das Tetraserum stellte ich wie folgt her: 10 ccm Milch wurden mit 1 ccm Tetrachlorkohlenstoff durchgeschüttelt, nach Zugabe von 0,2 ccm einer 20%igen Essigsäure durch einige kräftige Stöße durchmischt und das Koagulum sofort durch Papierfilter filtriert. Das Tetraserum filtrierte rasch und klar ab, das erhaltene Serum war durchsichtig klar und zeigte einen leichten grünlichen Schimmer.

Tabelle IV.

Kuh Nr.	Euterviertel	Agglutinationstiter		
		Labserum	Essigsäureserum	Tetraserum
696	vo. re.	20	40	40
	hi. re.	400	400	400
	hi. li.	200	200	200
748	vo. re.	80	100	100
	vo. li.	100	100	100
	hi. re.	80	80	100
	hi. li.	40	40	40
829	vo. re.	80	100	100
	vo. li.	200	200	200
	hi. re.	20	40	40
	hi. li.	200	200	200
Marktmilch		neg.	neg.	neg.
Testflüssigkeit (Kontrolle)		neg.		

Beurteilung des Essigsäure- und Tetraserums.

Die Titerhöhe der Milchproben stimmte im Essigsäureserum und im Tetraserum mit dem Labtiter ziemlich genau überein. In keiner Probe war der Titer im Essigsäure- oder Tetraserum niedriger als im Labserum.

Einige Essigsäure- und Tetraseren agglutinierten noch eine Verdünnung höher als das Labserum.

Das Essigsäureserum hat den großen Nachteil, daß es langsam und trübe filtriert, wodurch die Agglutination oft undeutlich und die Beurteilung der eingetretenen Reaktion erschwert wird.

Das Tetraserum hat sich bei meinen Versuchen als das geeignetste Milchserum zum agglutinatorischen Nachweis von Bang-Bakterien in der Milch erwiesen. Seine Hauptvorzüge sind:

1. Es ist klar,
2. auf einfache Weise, schnell und sicher zu gewinnen.
3. Die Agglutination ist im Tetraserum deutlicher und klarer als im Labserum.
4. Das Filtrieren kann durch das für die Massenuntersuchung etwas bequemere Zentrifugieren ersetzt werden.
5. Das Tetraserum kann aus jeder frischen, alten, sowie konservierten Milch klar gewonnen werden.

Während das Labserum, das oft wegen starker Trübung wenig befriedigt und die Beurteilung der Agglutinationsergebnisse sehr erschwert, *2 — 24* Stunden zur Gewinnung je nach der Herstellungsweise braucht, kann das Tetraserum in wenigen Minuten gebrauchsfertig hergestellt werden.

Im weiteren prüfte ich noch, wie sich Zentrifugieren, Filtrieren mit Hart- und Weichfiltern auf die Klarheit des Tetraserums auswirkte.

Die Proben zentrifugierte ich 5 Minuten lang bei 2000 Umdrehungen. Zum Filtrieren verwandte ich Hartfilter (Schleicher-Schüll Nr. 575), Weichfilter (Schleicher-Schüll Nr. 597) und gewöhnliche Papierfilter. Das Hartfilterserum, das langsam abfiltrierte, war durchaus klar und zeigte einen feinen Stich ins Bläulich-Grüne.

Die mit Weichfiltern, gewöhnlichen Papierfiltern und durch Zentrifugieren gewonnenen Seren standen jedoch ersterem nur wenig nach, so daß auf die Verwendung von Spezialfiltern zu Massenuntersuchungen verzichtet werden kann.

Tabelle V.

Kuh Nr.	Euterviertel	Agglutinationstiter Labserum	Tetraserum Weichfilter	Tetraserum Hartfilter
696	vo. re.	20	40	40
	hi. re.	200	200	200
	hi. li.	200	200	200
748	vo. re.	40	40	40
	vo. li.	100	100	100
	hi. re.	100	100	100
	hi. li.	40	40	40
774	vo. re.	40	40	40
	vo. li.	40	40	40
	hi. re.	40	80	80
	hi. li.	100	100	100
822	vo. re.	100	100	100
	vo. li.	100	100	100
	hi. re.	40	40	40
	hi. li.	200	200	200

Testflüssigkeit (Kontrolle) neg.

Die Titerhöhe der mit Weich- und Hartfiltern gewonnenen Seren stimmen vollständig überein. Auch dem Labserum gegenüber besteht weitgehende Uebereinstimmung.

Konservierung des Tetraserums.

Um die Haltbarkeit des Tetraserums und sein Verhalten gegenüber Konservierungsmitteln zu prüfen, wurden einige Seren des lezten Versuches mit der Koch'schen Konservierungsflüssigkeit, die ich aus 5,5 Acid. carbolicum, 20,0 Glyzerin, 74,5 Aqua dest. herstellte, konserviert. Ich setzte sie dem Serum im Verhältnis 1:10 zu, und zwar gab ich 0,2 ccm tropfenweise unter ständigem Umschütteln zu 1,8 ccm des zu konservierenden Serums.

Die Proben wurden 10 Tage lang bei Zimmertemperatur aufgestellt und dann in der üblichen Weise verwendet, um einen Ueberblick über das Schicksal der Antikörper in den konservierten Seren zu erhalten.

Tabelle VI.

Agglutinationstiter

Kuh Nr.	Euterviertel	Labserum konserv.	Labserum urspr. T.	Tetraserum konsers.	Tetraserum urspr. Titer
	hi. re.	40	40	80	80
774	hi. li.	100	100	100	100
	vo. re.	40	40	40	40
	vo. li.	80	100	100	100
748	hi. re.	80	100	100	100
	hi. li.	40	40	40	40
	vo. re.	80	100	100	100
822	vo. li.	200	200	200	200

Testflüssigkeit (Kontrolle) neg.

Pektin.

Die Pektinstoffe, die bei der Obstverarbeitung eine bedeutende Rolle spielen, gehören den Hemizellulosen an und kommen in nahezu allen Früchten und Gemüsen vor. Die Pektinstoffe vermögen als kolloidale Lösungen in Gegenwart von Zucker und Säuren zu koagulieren, ein Vorgang, der sich mit der Labgerinnung der Milch vergleichen läßt.

Kieferle (19) hat die Wirkung des Apfelpektins auf Milch erforscht und dabei manche Möglichkeit für die Milchverarbeitung und die Verbesserung der Käsebereitung gesehen. Bei Zusatz von Apfelpektin zu Milch erfolgt eine Ausscheidung der Eiweißstoffe, besonders des Kaseins, das zusammen mit dem mitgerissenen Milchfett sich als dicke Emulsion zu Boden setzt. Diesen Vorgang bezeichnet Kiefele (19) als „Pektinphänomen". Von der Säure- oder Labfällung unterscheidet sich die Pektinfällung des Kaseins dadurch, daß das Eiweiß dabei nicht gerinnt, also wieder in Lösung gebracht werden kann.

Ziegelmayer (51) versuchte mit Pektin genuines Eiweiß aus Blut zu gewinnen und prüfte den Einfluß des Pektins auf Serumausscheidung, Retraktion und Gerinnungsgeschwindigkeit des Blutes.

Die Fähigkeit des Apfelpektins, Eiweißkörper aus der Milch auszufällen, veranlaßten mich, die Brauchbarkeit des Serums für Agglutinationszwecke zu prüfen.

Zur Herstellung des Pektinserums sezte ich der Milch bei Eisschranktemperatur (etwa 6 Grad C) 7—10 ccm Lattopekt*) zu

*) Das Lattopekt wurde mir in freundlicher Weise von der Lattopekt-Gesellschaft Frankfurt a. M. zur Verfügung gestellt, wofür ich auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank ausspreche.

und schüttelte die Mischung kräftig durch. Nach einiger Zeit hatte sich das Kasein und Teile des Milchfettes zu Boden gesetzt und ein gelb-grünes, trübes, fast undurchsichtiges „Serum" ausgepreßt.

Die Versuche, mit Lattopekt ein brauchbares Milchserum zur Agglutination zu erhalten, hatten nicht den gewünschten Erfolg. Die Serumabscheidung erfolgte langsam, trübe, für serologische Zwecke unbrauchbar. Die Technik war umständlich und zu schwierig für Massenutersuchungen.

Zusammenfassung.

Es wurden verschiedene Milchseren, die bei anderen Milchuntersuchungen verwendet werden, auf ihre Brauchbarkeit zur Milchserumagglutination auf Abortus-Bang, insbesondere für Massenuntersuchungen, geprüft. Dabei kamen nur solche Seren in Frage, die auf einfachem Wege, mit einfachen chemischen Mitteln, schnell, billig und klar gewonnen werden konnten, als Ersaz für das Labserum, das vielfach erst nach umständlichen und zeitraubenden Klärungsversuchen genügend klar erhalten werden kann.

Aus meinen Versuchen konnte ich folgendes ableiten:

1. Bleiserum und Ammoniumsulfatserum eigneten sich nicht zum agglutinatorischen Nachweis von Bang-Bakterien in der Milch, da die Agglutinine zum großen Teil mit dem Kasein ausgefällt werden.

2. Kupferserum und Essigsäureserum sind brauchbar. Allerdings wird auch bei der Kupferserumgewinnung durch das Kupfersulfat ein geringer Teil der Agglutinine ausgefällt

   Das Essigsäureserum hat den Nachteil, daß es langsam und trübe filtriert und die Beurteilung des Agglutinationsergebnisses erschwert.

3. Das Tetraserum hat sich bei meinen Untersuchungen als Ersatz für das Labserum am geeignetsten erwiesen. Es erfüllt weitestgehend die für Massenuntersuchungen geforderten Eigenschaften. Vor dem Labserum hat es den Vorzug, daß es in kürzester Zeit sehr klar hergestellt werden kann, während beim Labserum bis zu 24 Stunden vergehen, bis es zur Verfügung steht, wobei noch vielfach die Klarheit sehr wenig befriedigt.

   Das Tetraserum läßt sich durch Zentrifugieren oder Filtrieren aus jeder frischen, alten oder konservierten Milch gewinnen.

   Das Tetraserum verkürzt, erleichtert den Nachweis von Bang-Bakterien in der Milch, wobei gleichzeitig das Agglutinationsergebnis sicher, klar und eindeutig zu gewinnen ist.

Schrifttum.

1. Bächer, St.: Konzentration und Reindarstellung der Antikörper, in Kolle, Kraus, Uhlenhuth: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 3. Aufl. 1929, Bd. II, 1. S. 203.
2. Beau, M.: Eine neue Theorie über die Wirkung des Lab auf das Casein der Milch. Chem. Zentralbl. 103, II, 1 (1932) 1984.
3. Beckel, A.: Das Kupferserum der Milch. Zeitschr. f. Untersuchung der Lebensmittel. 62 (1931) 170.
4. Coolidge, H. L.: Agglutination Test as a Means of Studying the Presence of Bacterium Abortus in Milk. Journ. of Agricult. Research (Washington) 5 (1916) 871.
5. Diernhofer, K.: Molken-, Milchserum- und Milchschnellagglutination als Hilfsmtitel zur Feststellung der Brucellabesiedlung des Kuheuters. Wiener tierärztl. Monatsschr. 20 (1933) 97.
6. Dopter, P.: Recherches de foyers d'infection mélitococcocique par séro-agglutinations dans le lait. Zentralbl. f. Bakt. I. Ref. 121 (1936) 251.
7. Ernst, W.: Grundriß der Milchhygiene für Tierärzte. Verlag Enke, Stuttgart, 2. Aufl. 1926.
8. Frangulis, J. E.: Verfahren zur Herstellung von Milchserum durch basisches Bleiazetat. Chem. Zentralbl. 104 II, 2 (1933) 2340.
9. Fuest, J.: Vergleichende Untersuchungen über den Nachweis von Brucella abortus in Einzel- und Gruppenmilchproben. Inaug.-Diss. Gießen (1935).
10. Gilman, H. L.: The Elimination of Bacterium Abortus in the Milk of Cows. The Cornell Veterinarian XX (1930) 106.
11. Grimmer, W.: Leitfaden der Milchhygiene. München und Leipzig 1922.
12. Hall, J. C. and Learmonth, R.: A Method for Securing clear Serums from the Milk of Cows and Goats for Agglutination Tests. Journ. of infect. Diseases. 52 (1933) 27.
13. Hammarsten: Physilog. Chemie (1904) 465.
14. Happe, H. und Neumark: Ueber die Verbreitung der Banginfektion bei Mensch und Rind in Berl. Zentralbl f. Bakt. Orig. 128 (1933) 349.
15. Hetz, J.: Untersuchungen über den Nachweis des Bang'schen Abortus-Bazillus in der Milch unter besonderer Berücksichtigung seines Vorkommens in der Stuttgarter Marktmilch. Inaug.-Diss. Gießen 1921.
16. Karsten: Ueber die Feststellung des seuchenhaften Verkalbens durch den Nachweis von Agglutininen und komplementablenkenden Ambozeptoren im Milchserum der Kühe. Deutsche tierärztl. Wochenschr. 39 (1931) 561.
17. Derselbe: Ueber den serologischen Nachweis der Euterturberkulose und dessen Verwendbarkeit bei der Durchführung des freiwilligen Tuberkulose-Bekämpfungsverfahrens und der Vorzugs- und Markenmilch-Ueberwachung. Deutsche tierärztl. Wochenschr. 41 (1933) 561.
18. Karsten und Bischoff: Weitere Untersuchungen über den Abortusnachweis mit der Milch. Deutsche tierärztl. Wochenschr. 41 (1933) 593.
19. Kieferle, F.: Das Pektin-Phänomen der Milch. Deutsche Molkereizeitung, Kempten i. Allg. Nr. 1. v. 4. 1. 1934.

20. Klimmer, M.: Milchkunde. Verlag Richard Schoetz, Berlin, 2. Aufl. 1932.
21. Kluge, K.: Ueber die Anwendbarkeit des Ammoniumsulfatgrenzserums der Milch bei serologischen Untersuchungen. Zeitschr. f. Untersuchung der Lebensmittel. 71 (1936) 415.
22. Kraus, R., Kovács, N., und Paltauf, R.: Agglutination und Agglutinine, in Kolle, Kraus, Uhlenhuth: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 3. Aufl. 1929, Bd. II, 2, S. 789.
23. Lübke, A.: Untersuchungen einer latent infizierten, mit der Milch Bangbakterien ausscheidenden Kuh. Arch. f. Tierheilkunde. 67 (1934) 436.
24. Mc Fadyean und Stockman: Zit. n. Zeller. Arch. f. wissenschaftl. und prakt. Tierheilkunde. 49 (1922) 65.
25. Marcis: Jahresber. der Vet. Med. 45 (1925) 61.
26. Meyer, F.: Sind durch Agglutination und Meinicke-Klärungsreaktion des Blutes und der Milch in Abortusbeständen die euterinfizierten Tiere zu ermitteln? Inaug.-Diss. Hannover (1932).
27. Mitchell and Humphreys: Studies in Brucella Melitensis (Abortus) Infection of Cattle. The Cornell Veterinarian. XXI. (1931) 57.
28. Neudert, W.: Der Labungsvorgang in seinen vier Phasen und seine Abhängigkeit von äußeren Faktoren. Milchwirtschaftl. Forschungen. 18 (1936) 87.
29. Nieland, H.: Die Abortus-Bang-Infektion der Milch und ihre Erkennung mit Hilfe der Agglutination. Berliner tierärztl. Wochenschr. 50 (1935) 709.
30. Olitzki, C.: Studien über das physikalisch-chemische Verhalten der Agglutinine. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. 58 (1928) 244.
31. Pfleiderer, R.: Ein Beitrag zur Pepsin- und Labwirkung. Arch. f. d. gesamte Physiologie (Pflüger's Arch.) 66 (1897) 605.
32. Pfyl, B., und Turnau, R.: Ueber verbesserte Herstellung der Milchseren und ihre Anwendbarkeit zur Untersuchung der Milch. Arb. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt. 40 (1912) 245.
33. Poeschl, H.: Beitrag zum Nachweis der Bang'schen Abortusbazillen in der Milch. Inaug.-Diss. München (1933).
34. Pomper, W.: Ueber das Vorkommen von Agglutininen und Ambozeptoren in der Milch abortuskranker Kühe. Inaug.-Diss. Leipzig (1920).
35. Proescholdt, O.: Die Feststellung der Ausscheidung von Abortus-Bang-Bakterien mit der Milch. Deutsche tierärztl. Wochenschr. 40 (1932) 673.
36. Reinhardt, R., und Gauß, K.: Untersuchungen über das Vorkommen von Antikörpern gegenüber dem Bazillus abortus infectiosi im Blut und in der Milch abortus-kranker Tiere. Zeitschr. f. Infektionskrankheiten der Haustiere. 16 (1914) 219.
37. Riedmüller, L.: Ergebnisse der Milchschnell- und Milchlangsamagglutination. Schweizer Arch. f. Tierheilkunde 76 (1934) 279.
38. Robinson: Zit. n. Pomper, W.: Inaug.-Diss. Leipzig (1920).
39. Rothenfusser, S.: Das Bleiserum der Milch. Zeitschr. f. Untersuchung der Lebensmittel. 60 (1930) 94; 62 (1931) 202.
40. Scheibe, H.: Beweist ein positiver Agglutinationswert des Milchserums das Ausscheiden von Abortusbakterien mit der Milch? Tierärztl. Rundschau. 43 (1937) 417.
41. Schönberg, F.: Ueber den Nachweis von Abortus-Bang-Bakterien bei der amtlichen Milchüberwachung. Berliner tierärztl. Wochenschr. 49 (1933) 329.
42. Seddon, H. R.: Some Observations on the Methods of using the Agglutination Test in the Diagnosis of the Disaese in Bovines caused by the Bacillus of Contagious Abortion. Journ. of compar. Pathol. and Therap. (London) 28 (1915) 20.

43. Stockmayer, W.: Untersuchung über die Bangbakterien-Infektion des Euters, über den Verlauf der Ausscheidung der Bangbakterien und ihre Feststellung. Arb. aus d. Reichsgesundheitsamt. 70 (1936) 167.

44. Summa, H.: Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Bakterium Abortus-Bang in Milch. Inaug.-Diss. Gießen (1934).

45. Vellisto, E.: Einiges über den Milchagglutinationtiter bei der Banginfektion der Kühe. Zentralbl. f. Bakt., Ref. 118 (1935) 483.

46. Wall, S.: Ueber die Feststellung des seuchenhaften Abortus beim Rind durch Agglutination und Komplementbindung. Zeitschr. f. Infektionskrankheiten d. Haustiere. 10 (1911) 132.

47. Winkler, M.: Ueber die Ausscheidung des Bazillus abortus Bang mit der Milch. Inaug.-Diss. Leipzig (1919).

48. Wurster, K.: Die Molkenabscheidung bei der Labgerinnung. Milchwirtschaftl. Forschungen. 16 (1933) 200.

49. Zeller, H.: Weitere Untersuchungen über das seuchenhafte Verwerfen des Rindes. Arch. f. wissenschaftl. und prakt. Tierheilkunde. 49 (1922) 65.

50. Derselbe: Neuere Forschungsergebnisse über Brucellen und Brucellosen. Münchner tierärztl. Wochenschr. 84 (1933) 337.

51. Ziegelmayer, W.: Die Pektinwirkung auf die Zustandsänderung der Milch und ihrer Stapelprodukte, insbesondere auf die Verdaulichkeit der Käse. Colloid-Zeitschr. 70 (1935) 211.

52. Zimmermann, E.: Die baktericide Wirkung der organischen Säuren gegenüber Bangbazillen. Möglichkeit einer Chemotherapie. Zentralbl. f. Bakter. Orig. 134 (1935) 215.

Das vorliegende Thema wurde mir vom Vorstand des Tierhygienischen Instituts der Universität München überlassen.

Dafür und für die jederzeit mir entgegengebrachte Hilfe möchte ich zum Schluß der Arbeit meinen verbindlichsten Dank erstatten.

Lebenslauf.

Am 5. April 1913 wurde ich, Emil Knödler, in Oberbettringen, Oberamt Schwäbisch-Gmünd, geboren als Sohn des Schreinermeisters Franz Xaver Knödler und seiner Ehefrau Ottilia, geb. Seitz. Nach Besuch der Volksschule in Oberbettringen trat ich in das Realgymnasium in Schwäbisch-Gmünd ein und erhielt dort am 4. 3. 1933 das Reifezeugnis.

Vom Sommersemester 1933 ab widmete ich mich dem Studium der Tiermedizin an der Universität München, wo ich am Ende des Sommersemesters 1934 den naturwissenschaftlichen und am Schlusse des Wintersemesters 1934/35 den anatomisch-physiologischen Abschnitt der tierärztlichen Vorprüfung bestand.

Vom 1. April bis 30. September 1935 unterbrach ich mein Studium, um meiner halbjährigen studentischen Arbeitsdienstpflicht in Mühlhausen a. N. zu genügen. Im Wintersemester 1935/36 setzte ich mein Studium an der Universität München fort und war dort bis zum Schlusse des Wintersemesters 1937/38 eingeschrieben.

Mit vorliegender Arbeit befaßte ich mich vom Mai 1937 bis März 1938.